

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/086437 A1

- (51) 国際特許分類?: A61K 35/78, 県 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内  
A61P 9/10, A23L 1/30, 1/36 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04607 (74) 代理人: 高島一 (TAKASHIMA,Hajime); 〒541-0044  
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号藤村  
大和生命ビル Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2003年4月11日 (11.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:  
特願2002-110932 2002年4月12日 (12.04.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315  
東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小山直人 (KOYAMA,Naoto) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 栗林かんな (KURIBAYASHI,Kanna) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 石井康一 (ISHII,Koichi) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 小林克徳 (KOBAYASHI,Katsunori) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

A1

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING ARTERIOSCLEROSIS

(54) 発明の名称: 動脈硬化予防用組成物

(57) Abstract: It is intended to provide an excellent composition for preventing arteriosclerosis and foods and medicinal compositions containing this composition. Namely, a composition which can be obtained by extracting defatted plant seeds with an organic solvent and foods and medicinal compositions containing this composition.

(57) 要約: 優れた動脈硬化予防用組成物、及び該組成物を含有する食品並びに医薬組成物を提供する。脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出によって得ることができる組成物、及び該組成物を含有する食品並びに医薬組成物とする。

明細書  
動脈硬化予防用組成物  
技術分野

本発明は、脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出することにより得ることができる動脈硬化予防用組成物、及び該動脈硬化予防用組成物を含有する食品並びに医薬組成物に関する。

背景技術

近年のライフスタイルの欧米化に伴い、狭心症、間歇性跛行、心筋梗塞、脳梗塞などといった動脈硬化性疾患が、ガンと並んで日本人の死因のトップを形成するようになった。これらの疾患は一度発症すると治癒が非常に難しく、QOL（生活の質）を著しく低下させることから、その予防、あるいは病態の進展をコントロールするための対策が社会的にも極めて重要であることは論を待たない。動脈硬化巣形成の初期には LDL（低比重リポタンパク）の酸化が重要な役割を果たしていることはほぼコンセンサスが得られていることから、血中コレステロールレベルを適切な領域に管理するだけでなく、酸化 LDL の生成を制御することの重要性が最近指摘されるようになってきた。食品、特に植物由来のものの中には豊富に抗酸化物質が含まれていることが分かっており、緑茶や赤ワインに含まれる抗酸化物質が LDL に取り込まれて（あるいはその近傍で）ラジカルを消去することにより酸化 LDL の生成を防ぐのではないかと考えられている (Fuhrman ら、Am. J. Clin. Nutr., 61: pp549-54, 1995)。これらの食品の積極的な摂取がガンや心臓病を抑制するとの疫学的研究もある (Renaud ら、Lancet, 339: pp1523-26, 1992)。

ところで、ゴマ種子リグナン、ブドウ種子ポリフェノールなどの特定種子由来の特定成分が実験動物に対して抗動脈硬化作用を示すとの報告はある (Kang ら、J. Nutr., 129: pp1885-90, 1999) (Yamakoshi ら、Atherosclerosis 142: pp139-49, 1999)。しかしながらこのように植物種子成分の動物実験レベルでの抗動脈硬化性が明らかにされた例はまだわずかであって、多くの研究は試験管レベルにとどまっているのが実情

である。例えば、特開平8-337536号公報には、植物種子を焙煎し、発酵処理したものから抽出した抗活性酸素作用剤が開示されている。この技術では、原料として植物種子を利用しているものの、焙煎、発酵処理などの操作を必要としているため汎用性が低く、実用的な方法ではない。  
5 また、動脈硬化抑制に効果を奏することは明確には示されていない。また、Zhang ら (Chem. Pharm. Bull., 45: pp1910-14, 1997) は、紅花の油粕から各種溶媒の分配操作により抽出した化合物群の構造を示し、それらの中にはインビトロで抗酸化活性を有するものがあることを示している。しかしながら、これらの抗酸化活性を有する化合物が動脈  
10 硬化予防に有効であることは現状では明らかではない。インビトロの抗酸化活性が生体における抗動脈硬化活性と必ずしも相関しないことが知られている (Fruebis ら、J. Lipid Res., 38: pp2455-64, 1997、Fruebis ら、Atherosclerosis 117: pp217-24, 1995、Munday ら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 18: pp114-19, 1998、Wagberg ら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 299: pp76-82, 2001) ことを考慮すると、植物種子中の抗酸化物質が抗動脈硬化性を有するか否かは、少なくとも実験動物レベルで確認される必要がある。

#### 発明の開示

本発明の目的は、生活習慣病の一つである動脈硬化を予防するために有効な組成物、及び該組成物を含有する食品並びに医薬組成物を提供することである。  
20

本発明者らは、上記目的を達成するために銳意研究をした結果、脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出により抽出される組成物が、インビトロの抗酸化作用ばかりでなく、実験動物で動脈硬化予防作用があることを  
25 見出し、この知見をもとに本発明を完成させるに至った。

本発明は、以下の物を提供する。即ち、

- (1) 脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出により得ることができる動脈硬化予防用組成物。
- (2) 植物種子は、紅花又は菜種の種子である上記(1)に記載の

組成物。

(3) 有機溶媒抽出は、脱脂後の植物種子から、低級アルコールで抽出することを含む上記(1)又は(2)に記載の組成物。

5 (4) 有機溶媒抽出は、低級アルコール抽出後、酢酸エステルで抽出することを含む上記(3)に記載の組成物。

(5) 有機溶媒抽出は、低級アルコール抽出後、低級アルコールを留去し、水を加え、水相を非極性溶媒で洗浄することを含む上記(3)又は(4)に記載の組成物。

10 (6) 低級アルコールは、エタノール又はメタノールである上記(3)乃至(5)のいずれか1項に記載の組成物。

(7) 酢酸エステルは、酢酸エチル、酢酸メチル又は酢酸プロピルである上記(4)乃至(6)のいずれか1項に記載の組成物。

(8) 非極性溶媒は、n-ヘキサンである上記(5)乃至(7)のいずれか1項に記載の組成物。

15 (9) 上記(1)乃至(8)のいずれか1項に記載の動脈硬化予防用組成物を含有する食品。

(10) 上記(1)乃至(8)のいずれか1項に記載の動脈硬化予防用組成物を含有する医薬組成物。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、実施例1における、各試料のLDLの被酸化性に及ぼす効果を示すグラフである。

25 図2は、実施例2において、紅花ミール抽出組成物、菜種ミール抽出組成物がapoE(-/-)マウス〔動脈硬化モデルマウス〕(投与5週目、14週齢)の大動脈での動脈硬化を抑制する効果を有することを示す写真であり、(a)は対照群を(b)は紅花群を(c)は菜種群を示す。

図3は、図2の概略図である。(a-1)は図2(a)の概略図であり、(b-1)は図2(b)の概略図であり、(c-1)は図2(c)の概略図である。図2の写真は、本来カラー写真であり、赤く染色されている部分が粥状斑である。図3は、図2の赤く染色している部分を明確に

するために図2の写真を作図し、赤く染色されている部分を黒く塗りつぶして示した概略図である。

図4は、V70添加によって誘導されるLDL酸化曲線（過酸化脂質生成曲線）を示すグラフである。

5 図5は、実施例3における、各試料投与15週目のapoEノックアウトマウス（21週齢、オス）の大動脈起始部病変面積を示すグラフである。図中、SFMは紅花ミール抽出組成物を、CSはp-クマロイルセロトニンを、FSはフェルロイルセロトニンを示す。

#### 発明の詳細な説明

10 本発明で用いる植物種子は、どの植物の種子でも良く、例えば紅花、菜種、大豆等の種子が挙げられるが、好ましくは、紅花又は菜種の種子である。本発明において植物種子とは、植物種子を構成する全体、あるいはその一部、例えば、種皮、胚乳、胚芽等を取り出したものでもよく、また、それらの混合物であってもよい。

15 本発明では脱脂後の植物種子、即ち脱脂物（ミール）を原料として用いる。植物種子の脱脂物は、自体公知の方法により植物種子を脱脂して得ることができるが、例えば種子を圧搾抽出するか又は種子の破碎物にn-ヘキサン等を加えて抽出した後、抽出系から固形分を取り出し、該固形分を乾燥して得ることができる。脱脂程度は、通常6割以上、好ましくは8割以上である。

20 本明細書で用いる「有機溶媒抽出」について説明する。本発明で用いる有機溶媒抽出で、脱脂後の種子から抽出する第1段階で用いる溶媒として、例えば、低級アルコール（含水低級アルコールも含む）、アセトン（含水アセトンも含む）、アセトニトリル（含水アセトニトリルも含む）、及びそれらの混合溶媒等が挙げられるが、それらに限定されない。好ましくは、低級アルコールである。低級アルコールとして、例えば炭素数1～4のアルコールが挙げられ、具体的には例えば、メタノール、エタノール、n-ブロパノール、イソブロパノール、n-ブタノール等が挙げられるが、これらに限定されない。低級アルコールは、好ましくはエ

タノール又はメタノール（含水エタノール又は含水メタノールを含む）である。これらの溶媒で抽出された組成物は、その純度で、本発明の組成物として有用であるが、更に純度を上げても（精製しても）良い。

更に純度を上げる（精製する）ための一例を以下に記載するが、これに限定されない。上記第1段階の溶媒抽出物の有機溶媒を留去（特に減圧留去）し、得られた抽出物に水を加えて懸濁し、該懸濁液（水相）を非極性溶媒、例えば、n-ヘキサン、n-ヘプタン、n-オクタン等、好ましくはn-ヘキサンで洗浄し、洗浄後の水層を、二層に分かれて目的の組成物を抽出できる溶媒、例えば、酢酸エステルやn-ブタノール等、好ましくは酢酸エステル、特に好ましくは、酢酸エチル、酢酸メチル、又は酢酸プロピルで抽出する。次いで、抽出液を飽和食塩水等で洗浄し、有機層を得る。酢酸エステルで抽出した場合、該有機層を、例えば、無水硫酸マグネシウム等で、脱水し、次いで減圧濃縮して、固体物（組成物）を得る。以上のどの段階で、精製を止めても良いし、いずれかの工程を省いても良いし、改変を加えても良いし、更に精製を進めても良い。上記溶媒の種類を変えることも含めて多段抽出法や向流分配法なども用いることができる。

上記の方法により得られた本発明の組成物を食品、医薬（動脈硬化予防剤等）として用いるときは、組成物が生理的に有害な溶媒中に存在する場合には、乾燥させたものか、又はその乾燥物を生理的に許容できる溶媒中に溶解、懸濁又は乳化させた物を用いる。組成物の形態として、水性液などの液状物や、減圧濃縮し乾固させた固体、凍結乾燥品などの固体物を含む。

本発明の動脈硬化予防用組成物は、インビトロで、ヒト血漿中のLDL（低比重リポタンパク）の酸化を抑制する。特に、紅花及び薬種の種子から得られる組成物は、とりわけ強くLDLの酸化を抑制する。特記すべきは、本発明の該組成物は、インビボで、マウスの血管内壁に形成される粥状斑（plaques）の形成を抑制し、実験動物で抗動脈硬化作用を示したことである。以上のことから、本発明の該組成物は、動脈硬化

予防剤などの医薬、動脈硬化予防用の食品として有用である。

本発明の組成物は、動脈硬化を予防する結果、動脈硬化に起因する疾患、例えば狭心症、心筋梗塞、間歇性跛行、脳梗塞等の予防に有用である。

5 本発明の「食品」は、食品全般を意味するが、いわゆる健康食品を含む一般食品の他、厚生労働省の保健機能食品制度に規定される特定保健用食品や栄養機能食品をも含むものであり、さらにサプリメントも含まれる。

10 食品又は医薬組成物として、本発明の上記組成物そのものを用いることができる。また、本発明の上記組成物を、様々な食品、例えば、ドレッシング、マヨネーズ等の一般食品（いわゆる健康食品を含む）に含有させて用いることもできる。更に、本発明の組成物を、賦形剤（例えば、乳糖、ショ糖、デンプン等）、場合によっては、香料、色素等と共に、錠剤、丸剤、顆粒、細粒、粉末、ペレット、カプセル、溶液、乳液、懸濁液、シロップ及びトローチ等に製剤化して、特定保健用食品や栄養機能食品等の保健機能食品、サプリメント、医薬製剤（医薬組成物）（主に経口用）として用いることができる。

15 特に、医薬組成物の場合、医薬として許容できる担体（添加剤も含む）と共に製剤化することができる。医薬として許容できる担体として、当業者公知のように、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、ショ糖、デンプン、D-マンニトール等）、結合剤（例えば、セルロース、ショ糖、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等）、崩壊剤（例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム等）、界面活性剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）、溶剤（例えば、水、食塩水、大豆油等）、保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸エステル等）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20 本発明の動脈硬化予防用組成物の摂取量又は投与量は、組成物の純度、対象人の年齢、体重、健康状態等によって異なるが、動脈硬化の予防用

として、通常、成人1日当たり10mg～10g、好ましくは、100mg～10gを1日1回から数回にわけて摂取又は服用するのが好ましい。

本発明の組成物は、従来から食用等として用いられてきた植物種子、  
5 特に、食用油の原料の紅花及び菜種の種子を用いるので毒性は極めて低く、副作用は殆ど認められない。

### 実施例

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に例示するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

#### 10 実施例1 (インビトロの抗酸化性データ)

搾油後の紅花ミール 100gに500mlの90容量%エタノール水を加え、60℃の湯浴中で3時間、加温、攪拌した後、ろ過した。ろ過後の固形分に対して同様の操作を1回行い、得られたろ過液を合一し減圧濃縮にて60mlの濃縮液を得た。濃縮液に水を加え200mlとし、  
15 内容物を懸濁した後、120mlのn-ヘキサンにて2回洗浄し、洗浄後の水層を酢酸エチル100mlで2回抽出した。酢酸エチル抽出液を飽和食塩水で洗浄後、酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、ろ過後減圧濃縮して固形物1.16gを得た。同時に、それぞれ搾油後の、  
20 菜種ミール、大豆ミール、大豆胚芽ミール、大豆種皮についても同様な処理を加えたものを調製し、1/10量の抽出物に1mlのDMSOを加え溶解したものを試料とした。

ヒトボランティアから得た血漿 (KBrにて比重=1.21 (g/ml)に調整) を不連続密度勾配遠心 (417,000 × g, 40 min, 4°C) (OptimaTLX; ベックマンコールター) にかけ、LDLのバンドをシリングで採取した。LDL画分のタンパク含量を測定し(BCAプロテインアッセイキット; ピアース)、終濃度 100 μg タンパク/mlとなるようにリン酸塩緩衝液 (PBS) で希釈したものに上記試料を 1/100 量添加した後、ラジカル開始剤 (V70; 2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)) を終濃度 1 mM 添加し、直ちに過酸化脂質中の共役ジエン構造に基づく 234 nm の吸収を

5 時間にわたってモニターした (DU640 ; ベックマンコールター)。得られた過酸化脂質生成曲線から、近藤ら (J. Nutr. Sci. Vitaminol., 43: pp435-44, 1997) の方法に従ってラグタイムを計算し、コントロール(対照)区(溶媒のみ添加)の値を 100 とした相対値で各試料が LDL の被酸化性に及ぼす影響を評価した(図 1)。いずれの試料も LDL の被酸化性を多かれ少なかれ抑制(すなわち、ラグタイムを延長)する傾向が見られたが、菜種ミールと紅花ミールはとりわけ強く LDL の酸化を抑制した。

上記の試験で、希釈されたヒト LDL と混ぜる前の段階での各試料の希釈倍率は、菜種ミール、紅花ミールは 200 倍希釈、他は 50 倍希釈である。  
10 これらのミール抽出物は、液体の状態なので、抽出前のミール換算にすると、菜種、および紅花ミール抽出物(200 倍希釈)では、それぞれ、菜種ミール、および紅花ミール換算で 0.05 g / m l であり、大豆ミール、大豆種皮、大豆胚芽ミール(50 倍希釈)では、それぞれ、大豆ミール、大豆種皮、大豆胚芽ミール換算で 0.2 g / m l である。すなわち、菜種ミール、紅花ミール抽出物の方がよりうすい濃度で強い抗酸化活性を示している。

#### 実施例 2 (インビボの動脈硬化予防効果)

菜種ミール、および紅花ミールの抽出物の調製は以下のようにして行った。

20 搾油後の菜種ミール 600 g に 3000 m l の 90 容量%エタノール水を加え、60 °C の湯浴中で 3 時間、加温、攪拌した後、ろ過した。ろ過後の固形分に対して同様の操作を 1 回行い、得られたろ過液を合一し減圧濃縮にて 500 m l の濃縮液を得た。濃縮液に水を加え 1000 m l とし、内容物を懸濁した後、500 m l の n-ヘキサンにて 2 回洗浄し、  
25 洗浄後の水層を酢酸エチル 500 m l で 2 回抽出した。酢酸エチル抽出液を無水硫酸マグネシウムで脱水し、ろ過後減圧濃縮して抽出物 12.5 g を得た。

搾油後の紅花ミール 600 g に対して上記と同様の操作を実施、10.1 g の抽出物を得た。

9 週齢の雄性 apoE ノックアウトマウス (apoE(-/-) ; ジャクソンラボラトリーより購入) を 1 群 9 匹として対照／菜種（菜種ミール抽出物投与群）／紅花（紅花ミール抽出物投与群）の 3 群に分け、各群ごとにそれぞれ表 1 に示すような組成の餌を 5 週間自由摂取させた。2 週目 (n=6)  
5 と 5 週目 (n=3) にマウスを屠殺し、大動脈起始部より大腿動脈分岐部までの大動脈を摘出し、Sudan IV で染色される血管内壁部分に形成された粥状斑（plaques）の面積を対照群のそれと比較した。2 週間の投与で菜種群、紅花群では対照群に比べて plaque 形成が抑制される傾向を示した。その後 3 週間延長投与された群同士の比較において上記の傾向は  
10 更に強まり（plaques 面積：紅花 < 菜種 < 対照）、これらの油糧植物ミール抽出物に動脈硬化の初期病変形成を抑制する効果があることが示された（図 2 および図 3）。

上記の試験で屠殺したマウスの腹部大静脈より血液を採取した。常法に従って分離した血漿 (KBr にて比重を 1.30 (g/ml) に調整) から不連続密度勾配遠心 (417,000 x g, 1hr, 4°C) (Optima TLX ; ベックマンコールター) によりリポタンパク画分をフラクショネーター (DGF-U ; 日立) で分画した。電気泳動 (マルチゲル-リポ ; 第一化学) で確認された各群の VLDL (超低比重リポタンパク) ~ LDL (低比重リポタンパク) 画分のタンパク含量を測定した後 (BCA プロテインアッセイキット ; ピアース)、  
20 終濃度が 50 μg タンパク/ml となるようリン酸塩緩衝液 (PBS) で希釈し、ラジカル開始剤 (V70 ; 2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethyl valeronitrile)) を終濃度 250 μM となるよう添加して直ちに 37°C にて過酸化脂質中の共役ジエン構造に基づく 234nm の吸収の測定を開始した  
25 (DU-640 ; ベックマンコールター)。投与群、対照群それぞれについて過酸化脂質生成曲線を描き、生成速度や生成量を比較した（図 4）。その結果、菜種、および紅花投与群のリポタンパク画分は、対照群のものに比べて最終的に過酸化脂質の蓄積が少なくなる（すなわち、酸化されにくくなる）ことが判明した（紅花 < 菜種 < 対照）。

[表 1]

群	飼料組成
対照	普通食 (20% (w/w) ビタミンフリーカゼイン、 66.3% スターチ、 5% コーンオイル、 3.5% AIN-93-ミネラル混合物、 1% AIN-93-ビタミン混合物、 0.2% 塩化コリン、 4% セルロース粉末)
菜種	普通食 + 1.3 % (w/w) 菜種ミール抽出物* *スターチでバランス
紅花	普通食 + 1.0 % (w/w) 紅花ミール抽出物* *スターチでバランス

### 実施例 3

6～7週齢の雄性 apoE ノックアウトマウス (ジャクソンラボラトリーより購入) を 1 群 7～10 匹として、対照 (Control) / セロトニン誘導体 0.2 重量% 投与区 (p-クマロイルセロトニン (CS)、フェルロイルセロトニン (FS) 各 0.1%) (CS+FS、0.2%) / セロトニン誘導体 0.4 重量% 投与区 (p-クマロイルセロトニン (CS)、フェルロイルセロトニン (FS) 各 0.2%) (CS+FS、0.4%) / フェルロイルセロトニン (FS) 0.4 重量% 投与区 (FS、0.4%) / 紅花ミール抽出物 (SFM) 1 重量% 投与区 (SFM、1%) の計 5 群に分け、各群ごとにそれぞれ表 2 に示すような組成の餌を 15 週間自由摂取させた。なお、本実施例で使用した紅花ミール抽出物 (SFM) は、実施例 2 に示した方法に従い調製されたものである。投与期間終了後、マウスを屠殺し、大動脈起始部の切片を作製して脂質沈着部位 (動脈硬化病変) をオイルレッド O で染色した。1 個体につき 3 枚の切片を作製し、そのうち最も大動脈弁が明瞭に認められる標本について画像解析 (WinROOF (三谷商事) 使用) を行い、Rajendra らの方法 (J. Lipid Res., 36: pp2320-2328, 1995) に基づいて病変面積を測定した。得られた病変面積については各群間で分散分析を行い、有意差が認められた場合に Scheffe 検定で群間の平均値を比較した。インビトロでの抗酸化活性、抗炎症性が知られている紅花ミール中の主要なフェノール性物質であるセロトニン誘導体 (Zhang ら、Chem. Pharm. Bull., 44: pp874-876, 1996, Kawashima ら、J. Interferon Cytokine Res., 18: pp423-428, 1998) は apoE ノックアウトマウスの病変形成を部分的に抑制したが、紅花ミール抽出物 (SFM、セロトニン誘導体を 10～30 重量% 含有) はそれ以上に

強く抑制することが判明した（図5）。

[表2]

組成	Control	g(飼料 1kg 中)			
		CS+FS, 0.2%	CS+FS, 0.4%	SFM, 1%	FS, 0.4%
ビタミンフリーカゼイン	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
コーンスターク	632.5	630.5	628.5	622.5	628.5
コーンオイル	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
ミネラル混合物(AIN-93G)	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
ビタミン混合物(AIN-93G)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
セルロース粉末	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
p-クマロイルセロトニン	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0
フェルロイルセロトニン	0.0	1.0	2.0	0.0	4.0
紅花ミール抽出物	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0
合計	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

### 産業上の利用可能性

5 本発明の脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出することにより得ることができる組成物は、動脈硬化予防に有用であり、天然由来の素材であるので、安全性が高く、副作用が殆ど無い。該組成物を含有する食品及び医薬組成物は、動脈硬化予防に有効である。

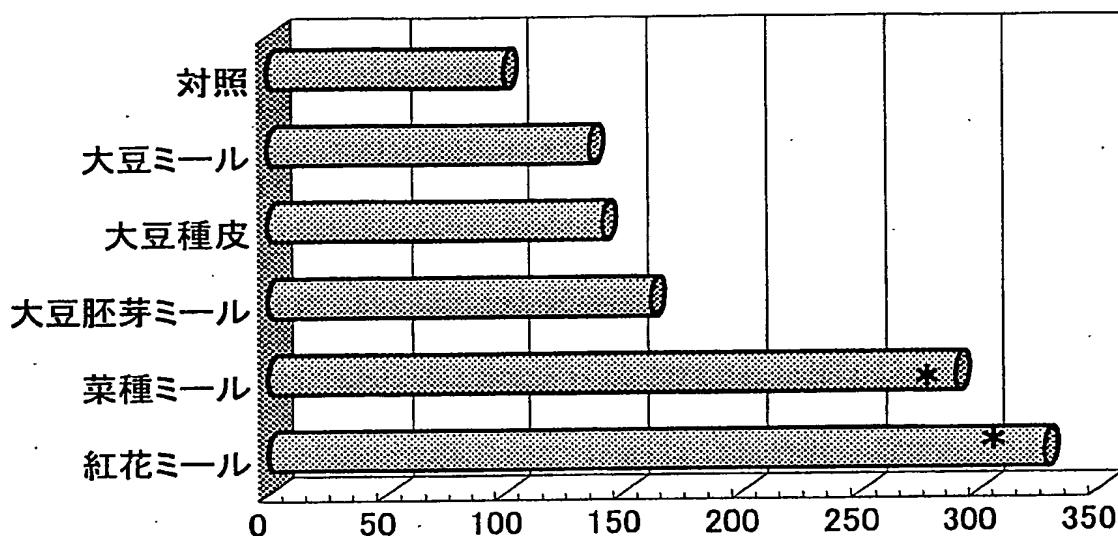
10 本出願は、日本で出願された特願2002-110932を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

1. 脱脂後の植物種子から有機溶媒抽出により得ることができる動脈硬化予防用組成物。
2. 植物種子は、紅花又は菜種の種子である請求項 1 に記載の組成物。
- 5 3. 有機溶媒抽出は、脱脂後の植物種子から、低級アルコールで抽出することを含む請求項 1 又は 2 に記載の組成物。
4. 有機溶媒抽出は、低級アルコール抽出後、酢酸エステルで抽出することを含む請求項 3 に記載の組成物。
5. 有機溶媒抽出は、低級アルコール抽出後、低級アルコールを留去し、  
10 水を加え、水相を非極性溶媒で洗浄することを含む請求項 3 又は 4 に記載の組成物。
6. 低級アルコールは、エタノール又はメタノールである請求項 3 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。
7. 酢酸エステルは、酢酸エチル、酢酸メチル又は酢酸プロピルである  
15 請求項 4 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。
8. 非極性溶媒は、n-ヘキサンである請求項 5 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。
9. 請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の動脈硬化予防用組成物を含有する食品。
- 20 10. 請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の動脈硬化予防用組成物を含有する医薬組成物。

図 1

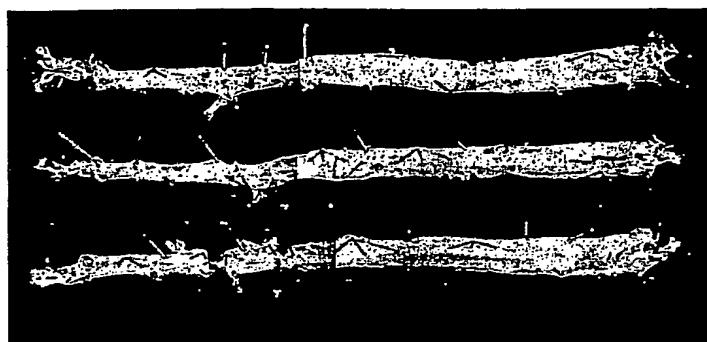
LDLの酸化されにくさ(対照=100)



(\* 菜種ミール、紅花ミールは 200 倍希釈、他は 50 倍希釈)

## 図 2

(a)



(b)

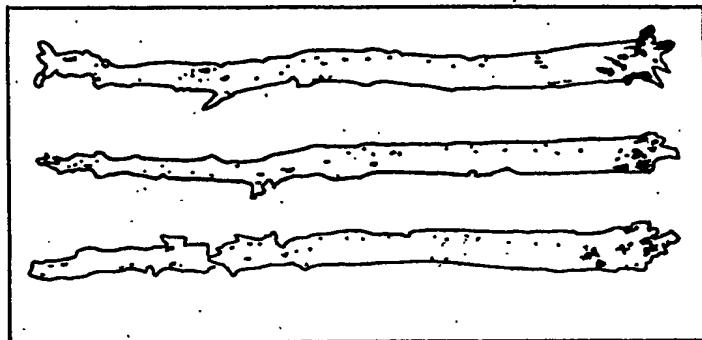


(c)

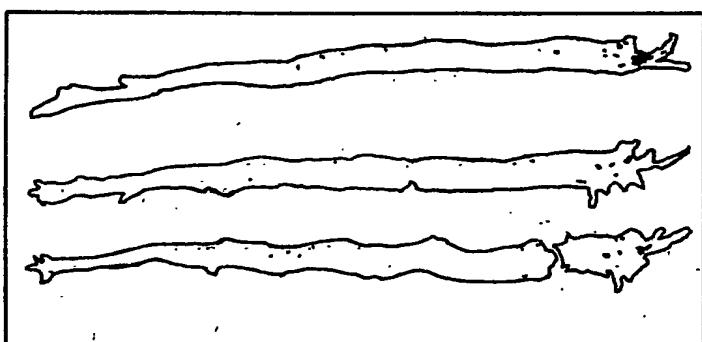


## 図 3

(a-1)



(b-1)



(c-1)

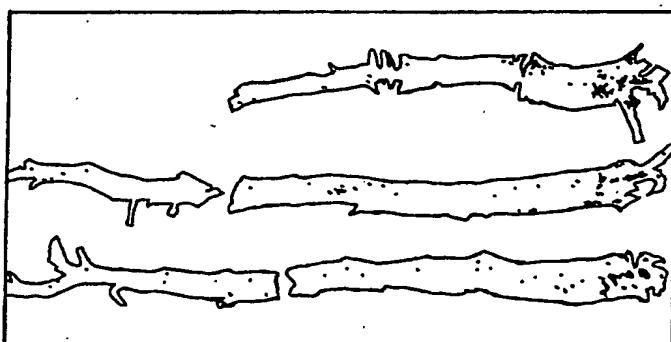


図 4

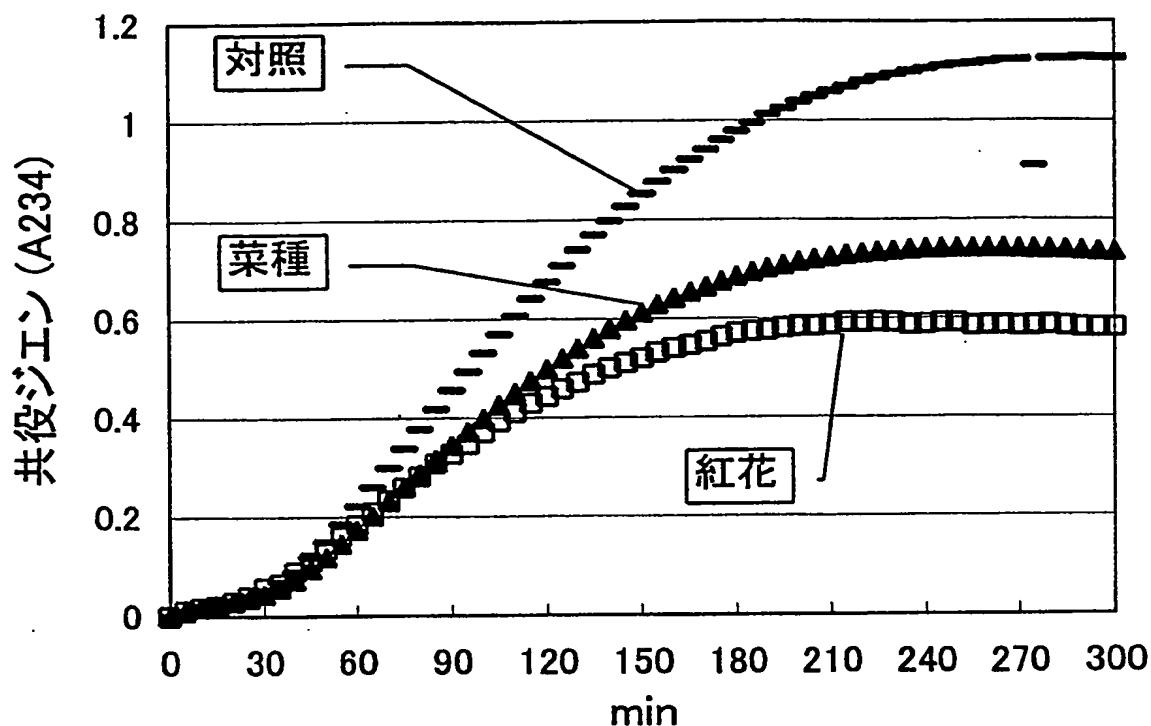
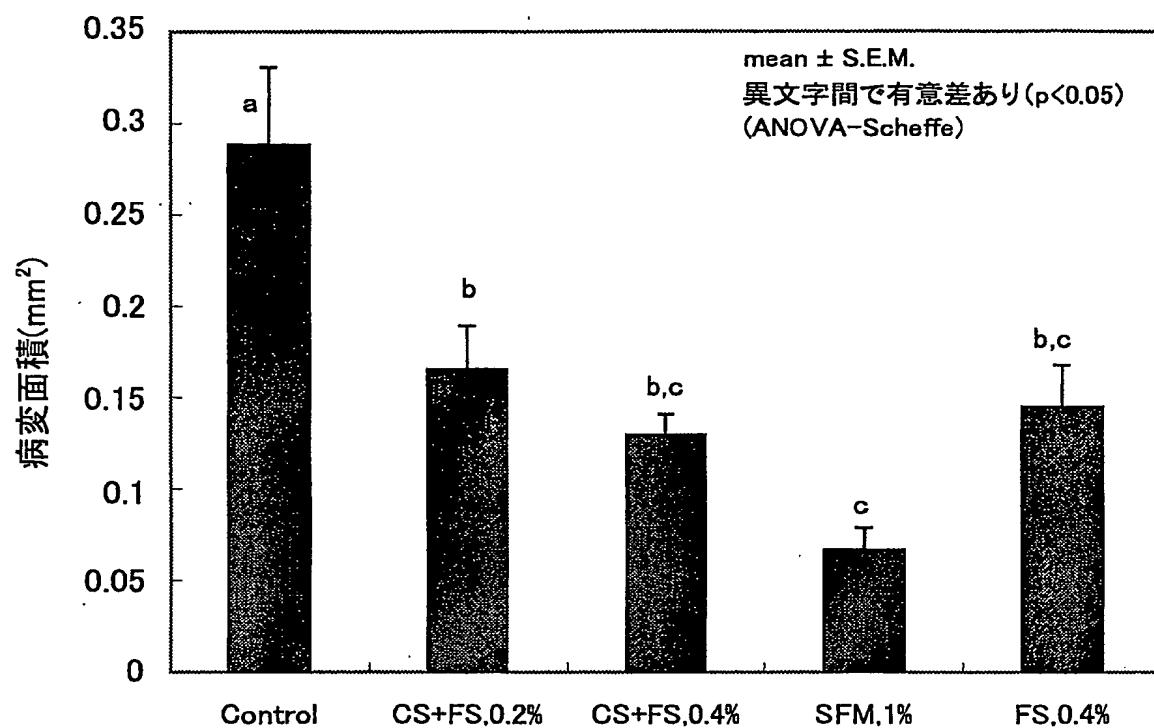


図 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04607

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A61K35/78, A61P9/10, A23L1/30, 1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61K35/78, A61P9/10, A23L1/30, 1/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), JSTPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 63-276450 A (Nippon Shokuhin Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 14 November, 1988 (14.11.88), (Family: none)	1,10
P, X	JP 2003-88334 A (FUJI OIL CO., LTD.), 25 March, 2003 (25.03.03), (Family: none)	1,10
X	WO 00/57898 A1 (FUJI OIL CO., LTD.), 05 October, 2000 (05.10.00), & AU 3454900 A	1,10
X Y	HUARD S. et al., Effects of mechanical treatment of whole canola seeds on carcass composition and blood lipids of lambs fed grass silage, Can.J. Anim. Sci., 1998, Vol.78, No.4, pages 665 to 671	1-3, 6, 10 5, 7-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	earlier document but published on or after the international filing date
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 16 May, 2003 (16.05.03)	Date of mailing of the international search report 27 May, 2003 (27.05.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04607

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kwang-Deog Moon et al., Safflower seed extract lowers plasm and hepatic lipids in rats fed high-cholesterol diet, Nutr.Res., 2001, Vol.21, No.6, pages 895 to 904	1-3, 6, 10 5, 7-9
Y		

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/04607

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K35/78, A61P9/10, A23L1/30, 1/36

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K35/78, A61P9/10, A23L1/30, 1/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)  
JSTPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 63-276450 A(日本食品化学工業株式会社)1988.11.14(ファミーなし)	1, 10
P X	JP 2003-88334 A(不二製油株式会社)2003.03.25(ファミーなし)	1, 10
X	WO 00/57898 A1(FUJI OIL CO. LTD)2000.10.05&AU 3454900 A	1, 10
X Y	HUARD S. et al, Effects of mechanical treatment of whole canola seeds on carcass composition and blood lipids of lambs fed	1-3, 6, 10 5, 7-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。, パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 16. 05. 03	国際調査報告の発送日 27.05.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴見 秀紀 4C 8415 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	grass silage, Can. J. Anim. Sci., 1998, Vol. 78, No. 4, pp. 665-671	1-3, 6, 10
Y	Kwang-Deog Moon et al, Safflower seed extract lowers plasma and hepatic lipids in rats fed high-cholesterol diet, Nutr. Res., 2001, Vol. 21, No. 6, pp. 895-904	5. 7-9